

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang. Waktu penelitian ini dilaksanakan selama \pm 5 bulan dari bulan januari 2018 sampai dengan bulan mei 2018.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain, (1) alat untuk pembuatan media yaitu alat-alat gelas (breaker glass, pipet ukur, pipet tetes, gelas ukur, corong kaca, spatula), pH meter, *microwave*, botol kultur, alumunium foil, plastik, karet, tisu, kertas label, masker, karet hisap, agar dispenser, timbangan analitik, freezer, dan autoklaf, (2) alat untuk penanaman planlet kentang yaitu Laminar Air Flow (LAF), *dissecting set* (pinset, scalpel, gunting), bunsen burner, hand sprayer, dan plastik warping, (3) alat untuk pengamatan yaitu penggaris, kamera dan alat tulis.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain planlet kentang varietas Granola kembang, alkohol 70 %, stok media MS yang meliputi unsur hara makro yang telah dilakukan pengenceran media menjadi $\frac{1}{4}$ MS, $\frac{1}{2}$ MS, $\frac{3}{4}$ MS dan 1 MS, zat pengatur tumbuh *Benzyl Adenin*(BA), spirtus, aquades steril, aquades, sukrosa dan agar-agar.

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan dua faktor perlakuan. Faktor pertama modifikasi media MS dan faktor kedua penambahan konsentrasi zat pengatur tumbuh *Benzyl Adenin* (BA)dengan berbagai

konsentrasi yang berbeda dan akan dikombinasikan, yang terdapat 7 perlakuan dan diulang sebanyak 3 kali. Perlakuan yang akan di uji adalah sebagai berikut.

Faktor 1 antara lain:

M1 : Pengenceran Media $\frac{1}{4}$ MS

M2 : Pengenceran media $\frac{1}{2}$ MS

M3 : Pengenceran media $\frac{3}{4}$ MS

M4 : Media 1 MS (MS0)

Faktor 2 antara lain:

B0 : ZPT BA $0 \mu\text{M}$

B1 : ZPT BA $20 \mu\text{M}$

B2 : ZPT BA $40 \mu\text{M}$

Dari masing-masing faktor tersebut akan di kombinasikan sebagai berikut.

M1B0 : Media $\frac{1}{4}$ MS + BA $0 \mu\text{M}$

M1B1 : Media $\frac{1}{4}$ MS + BA $20 \mu\text{M}$

M1B2 : Media $\frac{1}{4}$ MS + BA $40 \mu\text{M}$

M2B0 : Media $\frac{1}{2}$ MS + BA $0 \mu\text{M}$

M2B1 : Media $\frac{1}{2}$ MS + BA $20 \mu\text{M}$

M2B2 : Media $\frac{1}{2}$ MS + BA $40 \mu\text{M}$

M3B0 : Media $\frac{3}{4}$ MS + $0 \mu\text{M}$

M3B1 : Media $\frac{3}{4}$ MS + $20 \mu\text{M}$

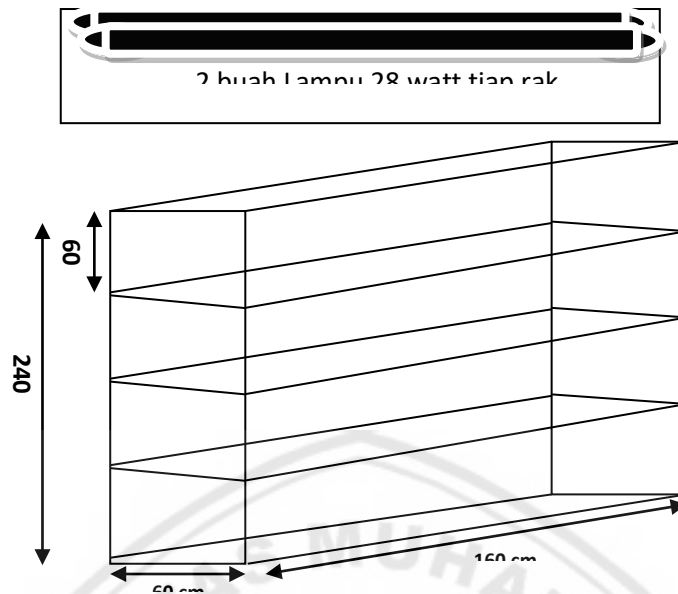
M3B2 : Media $\frac{3}{4}$ MS + $40 \mu\text{M}$

M4B0 : Media 1 MS + BA $0 \mu\text{M}$

M4B1 : Media 1 MS +BA $20 \mu\text{M}$

M4B2 : Media 1 MS + BA $40 \mu\text{M}$

3.4 Penampang Rak Kultur



Gambar 2. Penampang Rak Kultur

3.5 Tabel Penelitian

Tabel 1. Denah Penelitian

Tabel Penelitian		
Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
M1B0	M2B0	M3B0
M1B1	M2B1	M3B1
M1B2	M2B2	M3B2
M4B0	M3B0	M1B0
M4B1	M3B1	M1B1
M4B2	M3B2	M1B2
M2B0	M1B0	M4B0
M2B1	M1B1	M4B1
M2B2	M1B2	M4B2
M3B0	M4B0	M2B0
M3B1	M4B1	M2B1
M3B2	M4B2	M2B2

Keterangan : M1 : media $\frac{1}{4}$ MS , M2 : media $\frac{1}{2}$ MS, M3 : media $\frac{3}{4}$ MS, dan M4 : media 1 MS. B0 : tanpa ZPT BA, B1 : Penambahan ZPT BA 20 μ m, B2 : penambahan ZPT BA 40 μ m.

3.6 Pelaksanaan penelitian

Penelitian dilakukan dengan beberapa tahap yakni persiapan dan sterilisasi alat, pembuatan media, pembuatan media, sterilisasi media, persiapan planlet kentang, penanaman eksplan, dan inkubasi.

3.6.1 Persiapan dan Sterilisasi Alat

Proses persiapan dan sterilisasi alat yang akan dilakukan yakni sebagai berikut.

1. Mempersiapkan semua alat yang akan disteril meliputi, cawan petri, alat diseksi (pinset, scalpel, gunting) dan botol kultur
2. Merendam alat-alat yang akan digunakan menggunakan clorox 0,5% selama 1 hari satu malam
3. Membilas alat-alat yang telah direndam dengan clorox selama satu hari satu malam kemudian dikeringkan dengan memasukkan ke dalam oven selama \pm 1 jam
4. Sterilisasi cawan petri dan alat diseksi dilakukan dengan melapisi cawan petri alat diseksi dengan kertas dan dimasukkan ke dalam plastik, sedangkan botol kultur di tutup menggunakan plastik dan diikat dengan karet
5. Memasukan semua alat yang akan disterilisasi ke dalam autoklaf
6. Sterilisasi alat dilakukan dengan suhu 121°C selama 60 menit

3.6.2 Pembuatan Media

Proses pembuatan media kultur yang akan dilakukan yakni sebagai berikut.

1. Menyiapkan dan mensterilkan alat yang akan digunakan dalam pembuatan media

2. Menyapkan media MS seperti unsur hara makro dan mikro, vitamin, sukrosa dan agar yang telah dihitung dengan rumus pengenceran dengan volume awal 450 mL (lampiran1).
3. Membuat media $\frac{1}{4}$ MS yaitu dengan melakukan pengurangan atau pengenceran unsur hara makro pada media MS normal 4,5 mL menjadi 1,125 mL dimasukkan kedalam gelas ukur, dan menambahkan unsur hara mikro, vitamin tanpa dilakukan pengenceran.
4. Membuat media $\frac{1}{2}$ MS yaitu dengan melakukan pengurangan atau pengenceran unsur hara makro pada media MS normal 4,5 mL menjadi 2,25 mL dimasukkan kedalam gelas ukur, dan menambahkan unsur hara mikro, vitamin tanpa dilakukan pengenceran.
5. Membuat media $\frac{3}{4}$ MS yaitu dengan melakukan pengurangan atau pengenceran unsur hara makro pada media MS normal 4,5 mL menjadi 3,375 mL dimasukkan kedalam gelas ukur, dan menambahkan unsur hara mikro, vitamin tanpa dilakukan pengenceran.
6. Menambahkan aquades sampai volume 450 mL pada masing-masing media $\frac{1}{4}$ MS, $\frac{1}{2}$ MS, $\frac{3}{4}$ MS dan 1 MS.
7. Menambahkan sukrosa 13,5 gram dan agar-agar 3,6 gram yang telah ditimbang pada masing-masing media $\frac{1}{4}$ MS, $\frac{1}{2}$ MS, $\frac{3}{4}$ MS dan 1 MS.
8. Membagi menjadi 3 bagian pada masing media $\frac{1}{4}$ MS, $\frac{1}{2}$ MS, $\frac{3}{4}$ MS dan 1 MS dengan masing-masing volume aquades 150 mL dan dilakukan penambahan konsentrasi zat pengatur tumbuh *Benzyl Adenin* 0 μ M, 20 μ M, dan 40 μ M.
9. Mengukur pH dengan pH meter pada setiap media. pH optimal untuk pembuatan media adalah 5,6-5,8.

10. Menambahkan NaOH tetes pertetes jika pH media terlalu asam dan menambahkan HCl jika pH media terlalu basa sambil diaduk terus menerus agar larutan menjadi homogen dan tepat pengukuran pH-nya
11. Menambahkan agar yang telah ditimbang, bila pH sudah mencapai 5,6-5,8.
12. Memanaskan media dengan *microwaves* sampai mendidih dan merata.
13. Menuangkan masing media pada botol kultur yang telah di sterilisasi. Masing-masing botol di isi 15 ml media.
14. Menutup botol dengan menggunakan plastik yang telah disterilisasi dan diikat dengan karet gelang.

3.6.3 Sterilisasi Media

Proses sterilisasi media kultur yang akan digunakan yakni sebagai berikut.

1. Memasukkan botol kultur yang telah terisi media pada autoclave
2. Mensterilkan media dengan suhu 121 °C selama 10 menit
3. Mengambil media dalam autoklaf dan mendinginkannya sampai media benar-benar dingin kemudian memasukkan media ke dalam ruang kultur
4. Mendinginkan media 4 – 5 hari untuk mengetahui kontaminasi dari media kultur tersebut.

3.6.4 Persiapan Planlet Kentang (*Solanum tuberosum* L.)

Planlet kentang varietas granola yang akan dijadikan sebagai eksplan dalam penelitian ini adalah planlet kentang yang bebas dari kontaminasi, tidak layu,

tidak mengalami browning, sehat tidak ada tanda-tanda penyakit, dan yang dilakukan subkultur sebanyak 5 kali pada media MS0.

3.6.5 Penanaman Eksplan Kentang

Penanaman eksplan kentang yang akan dilakukan yakni sebagai berikut.

1. Mempersiapkan alat yang akan digunakan meliputi cawan petri, alat diseksi (pinset, scalpel, gunting), alkohol 96 % untuk steril alat diseksi dan bunsen burner
2. Memasukkan alat diseksi dan cawan petri ke dalam LAF
3. Menyalakan lampu UV selama 1 jam kemudian mematikan lampu UV setelah 1 jam dan menyalakan *blower*.
4. Memasukkan media kultur dan planlet kentang ke dalam LAF. Penanaman dilakukan setiap 1 hari sebanyak 1 kelompok.
5. Merendam alat diseksi ke dalam alkohol 96 % dan membakar alat tersebut sebelum digunakan
6. Mengeluarkan planlet kentang dalam botol dan memotong planlet kentang 1 buku batang planlet kemudian membuka tutup botol kultur yang berisi media perlakuan mendekatkannya ke bunsen burner dan menanam planlet ke dalam media. Satu botol media berisi 4 sampel tanaman kentang.
7. Menutup kembali botol dengan plastik dan mengikat dengan karet sebanyak 2 lapisan plastik penutup dan melapisinya dengan plastik warping botol untuk meminimalisir kontaminasi.

3.6.6 Inkubasi

Inkubasi dilakukan di ruang kultur dengan kondisi ruangan yang steril dengan suhu dan cahaya yang terkontrol. Dalam tahap ini botol kultur yang telah

ditanami di simpan di rak kultur dengan suhu $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ dengan pencahayaan lampu 28 watt. Inkubasi ini dilakukan selama penelitian selesai, usahakan keadaan ruang kultur dengan kondisi bersih dan bebas dari bakteri, cendawan, semut. Hal ini untuk menghindari terjadinya kontaminasi terhadap media maupun eksplan pada botol kultur.

3.6.7 Parameter Pengamatan

Parameter pengamatan dilakukan satu minggu setelah tanam, pengamatan terdiri dari pengamatan pertumbuhan tunas planlet kentang, pengamatan persentase kontaminasi, dan pengamatan persentase hidup planlet kentang. Berikut ini adalah diskripsi parameter pengamatan yang diamati pada penelitian ini, yaitu sebagai berikut.

A. Pengamatan Pertumbuhan Planlet Kentang

1. Tinggi tunas, diukur dengan menggunakan penggaris dari muncul tunas pertama sampai ujung tunas tertinggi dari ke 4 sampel eksplan, tinggi tunas diamati satu minggu sekali selama 1 bulan.
2. Jumlah tunas, dihitung berapa banyak tunas baru yang muncul pada 4 sampel eksplan dengan interval satu minggu sekali selama 1 bulan.
3. Jumlah akar, dihitung berapa banyak akar yang muncul pada 4 sampel eksplan dengan interval satu minggu sekali selama 1 bulan
4. Jumlah daun, dihitung berapa banyak jumlah daun yang mekar pada planlet kentang dengan interval waktu satu minggu sekali selama 1 bulan pengamatan
5. Jumlah buku, dihitung berapa banyak jumlah buku pada planlet kentang dengan interval waktu satu minggu sekali selama 1 bulan pengamatan.

B. Pengamatan Persentase Kontaminasi Eksplan

Pengamatan persentase kontaminasi dilakukan dengan interval satu minggu sekali. Dengan menghitung persentase dari jumlah botol yang terkontaminasi, dengan rumus sebagai berikut.

$$\% \text{ kontaminasi} = \frac{\text{jumlah Botol Yang Terkontaminasi}}{\text{Jumlah Botol Keseluruhan}} \times 100\%$$

C. Pengamatan Persentase Hidup Planlet Kentang

Pengamatan persentase hidup planlet kentang dilakukan dengan interval satu minggu sekali setelah planlet kentang ditanam dan telah tumbuh pada botol kultur, setelah itu menghitung persentase hidup planlet dengan rumus sebagai berikut.

$$\% \text{ Hidup Planlet} = \frac{\text{jumlah planlet kentang yang hidup}}{\text{jumlah planlet kentang keseluruhan}} \times 100\%$$

D. Korelasi Antar Parameter Pengamata

Pengamatan korelasi dilakukan untuk menghitung nilai koefisien korelasi mengukur nilai kekuatan dan arah hubungan linier dari dua Parameter. Dua parameter dikatakan berkorelasi apabila perubahan salah satu parameter disertai dengan perubahan parameter lain, baik dari arah yang sama maupun dari arah yang sebaliknya.

3.6.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisa dengan uji F (anova). Penafsiran data dilakukan dengan cara uji lanjut menggunakan uji BNJ dengan taraf 5% untuk membandingkan pengaruh antar perlakuan, data disajikan dalam bentuk tabel.